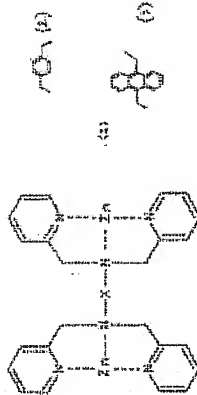


# RECEPTOR COMPOUND FOR PROTEIN OR PEPTIDE

Publication number: JP2001253871 (A)  
 Publication date: 2001-09-18  
 Inventor(s): HAMACHI TARU  
 Applicant(s): JAPAN SCIENCE & TECH CORP  
 Classification:  
 - International: G01N33/566; C07D213/36; C07K7/08; G01N33/566; C07D213/00; C07K7/00; C07K7/00; (IPC1-7): C07K7/08; C07D213/36; G01N33/566  
 - European:  
 Application number: JP20000066132 20000310  
 Priority number(s): JP20000066132 20000310

## Abstract of JP 2001253871 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an artificial receptor compound capable of selectively identifying a specific protein or peptide. SOLUTION: This receptor compound for protein or peptide is a metal complex expressed by formula (1) (X is, for example, an aromatic hydrocarbon group or a heterocyclic group each having methylene groups in two side chains and expressed by formulas 2, 3). The compound identifies protein or peptide of an &alpha;-helix structure having histidine residues existing in a specific recurring cycle and combines with it and has a character inducing a more regular &alpha;-helix structure.



Data supplied from the [esp@cerref database](mailto:esp@cerref database) — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P) (12) 公開特許公報 (A) (11) 特許出願公開番号  
 特開2001-253871  
 (P2001-253871A)  
 (43) 公開日 平成13年9月18日 (2001.9.18)

(51) IntCl.<sup>7</sup> F I  
 C 0 7 D 213/36  
 G 0 1 N 33/566  
 // C 0 7 K 7/08 Z N A  
 分類記号  
 C 0 7 D 213/36  
 G 0 1 N 33/566  
 // C 0 7 K 7/08 Z N A  
 特許庁 (参考)  
 4 C 0 5 5  
 4 H 0 4 5  
 Z N A

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁)

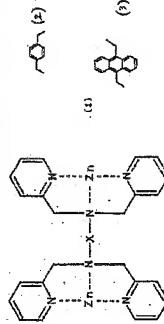
(21) 出願番号 特願2000-66132 (P2000-66132)  
 (22) 出願日 平成12年3月10日 (2000.3.10)  
 (71) 出願人 399720800  
 科学技術振興事業団  
 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
 (72) 発明者 浜地 格  
 福岡県福岡市早良区昭代2-8-8-504  
 (74) 代理人 100087675  
 弁理士 筒井 知  
 F ターム (参考) 4C055 A415 B402 B427 B801 B804  
 B810 C401 C402 C427 C810  
 D401 E403  
 4H045 B405 B417

(54) 【発明の名称】 タンパク質またはペプチドのレセプター化合物

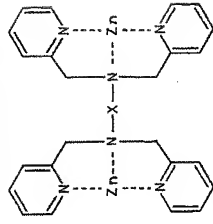
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 特定のタンパク質またはペプチドを選択的に識別することのできる人工レセプター化合物を提供する。

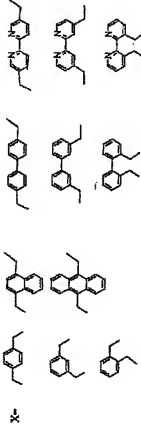
【解決手段】 下記一般式 (1) で表わされる金属錯体から成ることを特徴とするタンパク質またはペプチドのレセプター化合物。〔式 (1) 中、X は、例えば式 2, 3 で表される、2 つの側端にメチレン基を有する芳香族炭化水素基または複素環基を表わす。〕特定の周期でヒスチジン残基が存在する α-ヘリックス構造のタンパク質またはペプチドを認識し、これに結合して、より規則的な α-ヘリックス構造を誘起する性質を有する。



【特許請求の範囲】  
 【請求項1】 下記一般式(1)で表わされる金属錯体のレセプター化合物。  
 【化1】



【式(1)中、Xは、2つの側端にメチレン基を有する芳香族炭化水素基または複素環系基を表わす。】  
 【請求項2】 Xが、下記(2)に示すものの1つから選ばれ、



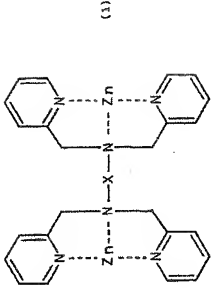
【発明の詳細な説明】  
 【0001】  
 【発明の属する技術分野】本発明は、人工レセプター化合物(合成レセプター分子)の分野に属し、特に、特定構造のタンパク質またはペプチドを選択的に認識し得るタンパク質またはペプチドのレセプター化合物に関する。

【0002】  
 【従来の技術】近年、生体系が示す高選択性で高精度の分子認識機能を模倣し、さらに、これを発展させた人工レセプターの研究が盛んに進められている。このような人工レセプター化合物は、生体内の諸プロセスや各種化学反応のメカニズム等を探索するための研究ツールとして利用されるときにも、その研究結果に基づき各種の機能素子、分離システム、薬剤などへの応用が期待されている。

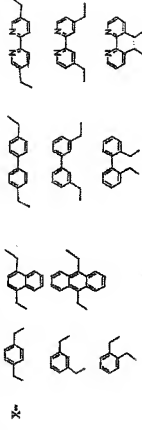
【0003】これまで知られている人工レセプターは、低分子化合物を認識(識別)するためのものが多い。高分子化合物については、DNAを対象とする研究が盛んに展開されており、これを特定のDNAの検出系に応用した例なども見出される。しかし、タンパク質表面にある官能基を認識し結合する人工レセプターの研究は殆ど行われていないのが現状である。この理由は、タンパク質表面に存在する官能基は高度に複雑な形状を呈しているため、分子認識にとって困難な場になっているためと考えられる。

【0004】タンパク質またはペプチド、特に、その基本構造である $\alpha$ -ヘリックス構造から成る特定のタンパク質またはペプチドを選択的に認識し得るレセプターを得ることができれば、その特性を利用して生体内の反応機構などを解明するための強力な研究手段として用いるとともに、新しい薬剤、試薬、機能素子等への開発に資するものと期待されるが、その例は殆ど見当たらない。

【0005】  
 【発明の目的】本発明の目的は、これまで殆ど例が見られない、特定のタンパク質またはペプチドを選択的に識別することのできる人工レセプター化合物を提供することにある。



ここで、式(1)中、Xは、2つの側端にメチレン基を有する芳香族炭化水素基または複素環系基を表わし、好ましくは、下記(2)に示すものの1つから選ばれる。



【0010】  
 【発明の実施の形態】本発明のタンパク質・ペプチドレセプター化合物を表わす式(1)においてXは、スベーパー部位を構成する。このスベーパーとなるXは、側端性のある分子が好ましく、(2)に示されるように、2つの側端にメチレン基を有する各種の芳香族炭化水素基または複素環系基から選ばれる。

【0011】式(1)で表わされるように、本発明のスベーパー化合物は、重鉛の周りに配位した2つの2'-ジピコリルアミン(以下、Dpa)と略称することがある)が、上記のごときスベーパー(X)を介して結合した構造から成る。この場合、Dpaは三座配位子であり、四面体構造をとる重鉛イオンに対し高い配位数(10<sup>+</sup>配)を示し、重鉛イオンの1つの配位子が空位となっている。

【0012】このような重鉛二核型の本発明のレセプター化合物はスベーパー(X)によって画定される距離に応じて、特定の周期でヒスチジン残基を有するタンパク質またはペプチドに対し、上記のように空位のある重鉛がヒスチジン残基に特異的に結合することにより、そのタンパク質またはペプチドを選択的に認識(識別)する機能を有する。例えば、スベーパーとしてp-キレンを有する重鉛二核型は、7個毎にヒスチジンが存在するアミノ酸配列を有するタンパク質またはペプチドに対して良好な認識を示し、また、スベーパーとしてアントラセンを導入したものは4個毎にヒスチジン残基をもつタンパク質またはペプチドを選択的に認識し得る。

【0013】このようにして、本発明のレセプター化合物は、水中において特定のタンパク質またはペプチド、すなわち、特定の周期でヒスチジン残基が存在し $\alpha$ -ヘリックス構造のタンパク質またはペプチドに結合し、これによって重鉛の周りに配位した2つの2'-ジピコリルアミン(B)と反応させることにより、スベーパー部位(X)を介して2つのDpaが結合した合成レセプター分子(C)が生成される。レセプター化合物となる所望の金属錯体(1)を得るには、この合成レセプター分子(C)を重鉛と混合するだけでよい、すなわち、重鉛は配位子置換活性であるため、平衡が非常に速いので、適当な緩衝液(例えば、ホウ酸緩衝液)でpHを調整した水溶液中で、合成レセプター分子と重鉛の塩(好ましくは錯体)を混合することで所望の錯体形成される。

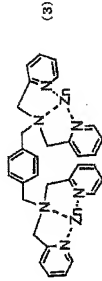
【0015】如上のように、本発明のレセプター化合物は、特定のアミノ酸配列を有するタンパク質またはペプチドを選択的に認識しこれに結合する性質を有する。

で、該アミノ酸配列をブロックすることにより、そのよ  
うなタンパク質やペプチドが関与する生体反応の機構解  
明や薬剤等の開発に当たって阻害剤として用いることが  
できる。さらに、本発明のレセプター化合物は、そのよ  
うな特定のタンパク質またはペプチドを検出したり分離  
する手段として応用関与される可能性も有する。

【0016】  
【実施例】以下に、本発明の特徴をさらに明らかにする  
ために実施例に沿って本発明を説明するが、本発明はこ  
の実施例によって制限されるものではない。なお、本明  
細書および図面中の構造式においては、当該分野で慣用  
されているように、炭素原子や水素原子を省略して示し  
ていることもある。

【0017】実施例1：p-キニレンビス(2, 2'-ジ  
ビコリルアミン)と亜鉛錯体の合成  
本発明に従うレセプター化合物として、スベアサーにp  
-キニレンを有し下記の式(3)で表わされる亜鉛二核  
錯体(以下、pXyDpa (Zn)<sub>2</sub>と略記する)を合  
成した。

【0018】  
【化5】



【0019】脱気窒素置換した100ml二口フラスコに  
p-キニレンジブロミド712mg (2.7mmol)、TB  
A 10.2g (0.54mmol/0.2eq) および炭酸カリウ  
M 1.1g (7.56mmol/3eq) を加え、乾燥DMF 2  
0ml に溶解させた。さらに、2, 2'-ジビコリルア  
ミン1.2g (6.0mmol/2.2eq) を加え、50℃で攪拌

1H-NMR (250MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, 25℃) 分析結果

δ/ppm	分割(J <sub>H</sub> /Hz)	積分比	理論比	帰属
3.67	s	4.31	4H	5
3.81	s	7.11	8H	6
7.09	t	4.10	4H	2
7.36	d	4.94	4H	4
7.63	m	7.48	8H	3, 7
8.50	d	4.00※1	4H	1

※1) 基準値

【0022】	501.48	501.64[M+H] <sup>+</sup>
マッススペクトル(EI-TOF) 分析結果	523.49	523.61[M+N+H] <sup>+</sup>
【0023】		

実測値(m/z)

計算値

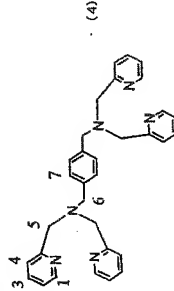
元素分析(C<sub>42</sub>H<sub>42</sub>N<sub>8</sub>+0.5H<sub>2</sub>O) 分析結果

元素	H	C	N	C/N
----	---	---	---	-----

を開始した。TLC(シリカゲル、MeOH)による反  
応追跡により2時間後にp-キニレンジブロミドの消失  
を確認した。反応が完全に進行したことを確認するた  
めに、反応溶液に少量サンプルリグし溶媒を減圧留去し  
た。残渣にクロロホルム10mlを加え、蒸留水で5回洗  
浄操作を行った。有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥  
後、溶媒を減圧留去した。さらに減圧乾燥を行い、1H

-NMR測定を行った。60時間後、残りの反応溶液につ  
いても同様の処理を行い、ガラムクロマトグラフィー  
(シリカ、CHCl<sub>3</sub>: MeOH: TEA=80: 2: 1)により精製し、橙黄色の化合物を得た。収量1.0g  
(74%)。1H-NMR、マッススペクトル分析(EI  
-TOF-MS)、および元素分析により同定すること  
により下記の式(4)(式中の数字は、後述のH-N  
MR分析における相対位置を示すためのものである)で  
表わされるp-キニレンビス(2, 2'-ジビコリルア  
ミン(pXyDpa)が生成されたことを確認した。ホ  
ウ酸緩衝液でpH8.0に調整した水溶液中で、pXyD  
paと酢酸亜鉛を混合することにより、目的のpXyD  
pa (Zn)<sub>2</sub>を得た。

【0020】  
【化6】



【0021】

【0024】実施例2：ペプチド結合実験  
図2に示すようなアミノ酸配列を有するペプチドを用い  
て結合実験を行った。各ペプチドは、16残基のアミノ酸  
から構成され、α-ヘリックス構造安定化のため、適当  
な位置にGlu-Lys(グルタミン酸残基-リシン残  
基)の導入、N末端のアセチル化による保護、C末端ア  
ミド型となっている。また、それぞれのペプチドには、  
レセプター分子の精製イオンと容易に配位し交換する金  
属配位能の高いHis(ヒスチジン残基)が異なる位置  
に存在する。すなわち、pep(15)は15位、pep  
(4, 15)は4位および15位、pep(8, 15)は8位お  
よび15位、pep(11, 15)は11位および15位に、それ  
ぞれ、ヒスチジン残基が存在する。

【0025】実施例1で合成したレセプターpXyDp  
a (Zn)<sub>2</sub>と、pep(8, 15)ペプチドに添加しCD  
スペクトルを測定した。測定は、10mMのホウ酸緩衝液  
でpH8.0に調整した水溶液中で、ペプチド濃度を50μ  
Mとし、これに0~5等量のpXyDpa (Zn)<sub>2</sub>を  
添加し、4℃で行った。得られたCDスペクトルチャ  
ーを図3に示す。

【0026】図3に示されるように、pXyDpa (Z  
n)<sub>2</sub>の添加によりα-ヘリックス構造に特徴的な222n  
mのCD強度の減少および2, 2'-ジビコリルアミン  
由来の誘起CD(248nm, 267nm)(図3右上の拡大  
参照)が観測され、余定数を算出するとlog K=  
4.5程度であることが明らかとなった。

【0027】さらに、連続変化法によるCDスペクトル  
測定により化学量論比の決定を行った。測定は、pep  
(8, 15)ペプチド+pXyDpa (Zn)<sub>2</sub>の濃度を100  
μMとしpH8.0(10mMのホウ酸緩衝液)の水溶液  
中、4℃で行った。その結果を図4に示されるように、  
α-ヘリックス由来の222nmおよび2, 2'-ジビコリ  
ルアミン由来の誘起CD(267nm)で評価したとこ  
ろ、いずれの場合でも0.5で最大値をとることから化学  
量論比は、1:1(ペプチド1molに対してレセプタ  
ー1mol)であることが明らかとなった。

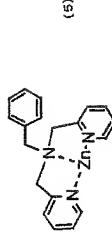
【0028】上記のようなCDスペクトル測定により、  
図2に示すHisの存在位置が異なる4種類のペプチド  
に対して、pXyDpa (Zn)<sub>2</sub>を等量添加した際  
のヘリックス含量の増加量を図5に示す。この際、コン  
トロール化合物として2, 2'-ジビコリルアミンが一  
つ導入された下記の式(5)で示される化合物[moo  
oDpa (Zn)<sub>2</sub>]についても評価を行った。

【0029】図5に示されるように、本発明に従うレセ  
プター化合物pXyDpa (Zn)<sub>2</sub>は、特にHisが  
7個毎に導入されているペプチド(pep(8, 15))

実測値	6.36	75.36	16.35	4.61
計算値	6.48	75.44	16.50	4.57
Δ	-0.12	-0.08	-0.15	+0.04

に対してα-ヘリックス含量の増加が確認された。これ  
は、pXyDpa (Zn)<sub>2</sub>の2つの2, 2'-ジビコリ  
ルアミン亜鉛錯体がスベアサーを介してちょうどHis  
のミッドポイントに配位し、ペプチドに結合すること  
でα-ヘリックス構造が誘起されたためと考えられる。こ  
の考察はコントロール化合物として評価したmonoD  
pa (Zn) では、Dpaが1つしか導入されておらず  
Hisは配位しても完結することができず、ペプチド  
(pep(8, 15))のα-ヘリックス構造が誘起され  
ていないことから裏付けられる。

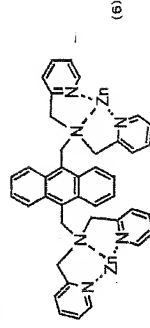
【0030】  
【化7】



monoDpa(Zn)

【0031】実施例3：ペプチド結合実験(その2)  
下記の式(6)で表わされるようにスベアサーとして9  
位および10位の側端にメチレン基を有するアントラセン  
を導入したレセプター化合物(9, 19AnthDDpa  
(Zn)<sub>2</sub>)を合成し、実施例2と同様に、図2の4種  
類のペプチドに添加しヘリックス含量の増加を観測し  
た。その結果を図6に示す。図6に示されるように、こ  
の場合、特にHisが4個のアミノ毎に導入されてい  
るペプチド(pep(11, 15))に対してα-ヘリック  
ス含量の増加が確認された。このように、本発明のアク  
セプター化合物は、スベアサーを変えることにより認識  
できるペプチドを変化させることができる。

【0032】  
【化8】



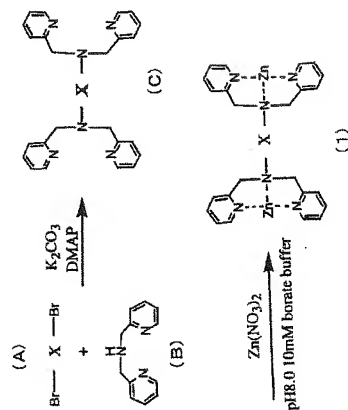
9,19AnthDDpa(Zn)<sub>2</sub>

【図面の簡単な説明】  
【図1】本発明のレセプター化合物となる亜鉛二核錯体  
の合成スキームを概示する。

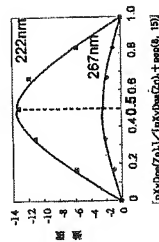
【図2】本発明のレセプター化合物のペプチド認識能を  
調べる結合実験において用いたペプチドのアミノ酸配列

【図3】本発明のレセプター化合物とペプチドとの結合実験におけるCDスペクトルチャートの1例である。  
【図4】本発明のレセプター化合物とペプチドとの結合実験において、それらの化学量論比を求めるために行った連続変化法によるCDスペクトルの強度変化を示す。  
【図5】本発明のレセプター化合物が特定のアミノ酸配列のペプチドを認識してα-ヘリックス構造を誘起することを示す実験結果の1例である。  
【図6】本発明のレセプター化合物が特定のアミノ酸配列のペプチドを認識してα-ヘリックス構造を誘起することを示す実験結果の別の1例である。

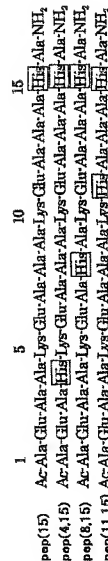
【図1】



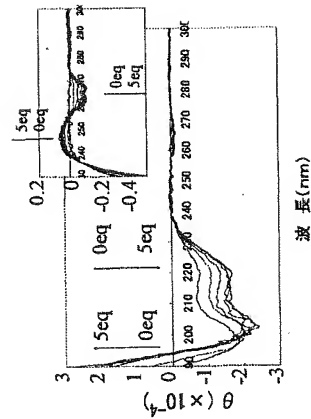
【図4】



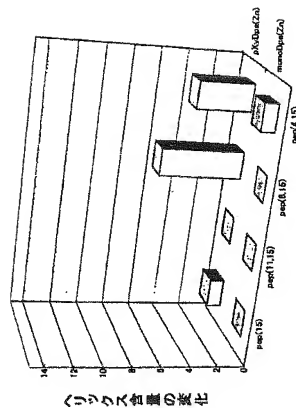
【図2】



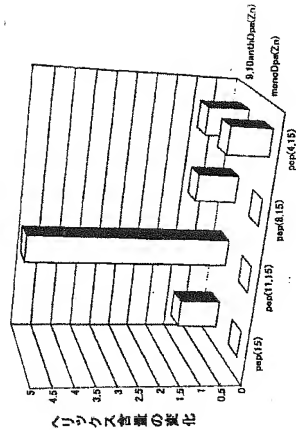
【図3】



【図5】



【図6】



【手続補正書】

【提出日】平成12年12月5日(2000. 12. 5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正内容】

【0024】変例2: ペプチド結合実験  
図2に示すようなアミノ酸配列を有するペプチドを用い、結合実験を行った。各ペプチドは、16残基のアミノ酸から構成され、α-ヘリックス構造安定化のため、適当な位置にGlu-Lys (グルタミン酸残基-リシン残基) の導入、N末端のアセチル化による保護、C末端アミド型となっている。また、それぞれのペプチドには、

レセプター分子の銅酸イオンと容易に配位子交換する金属配位能の高いHis (ヒスチジン残基) が異なる位置に存在する。すなわち、pep (15) は15位、pep (4, 15) は4位および15位、pep (8, 15) は8位および15位、pep (11, 15) は11位および15位に、それぞれ、ヒスチジン残基が存在する。なお、各ペプチドのアミノ酸配列は、pep (15) については配列番号: 1、pep (4, 15) については配列番号: 2、pep (8, 15) については配列番号: 3、pep (11, 15) については配列番号: 4とする。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

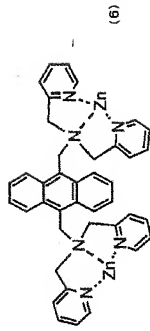
【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

:(8) 001-253871 (P2001-71

【補正内容】  
【0032】  
【化8】

【配列表】



9,10-AnthDpa(Zn) <sub>2</sub>	
SEQUENCE LISTING	
<110>: Japan Science and Technology Corporation	
<120>: Receptor compounds for proteins or peptides	
<130>: P01257	
<140>: JP2000-066132	
<141>: 2000-03-10	
<160>: 4	
<210>: 1	
<211>: 16	
<212>: PRT	
<213>: Artificial Sequence	
<400>: 1	
Ala	5
Glu	10
Ala	15
Ala	20
Ala	25
Ala	30
Ala	35
Ala	40
<210>: 2	
<211>: 16	
<212>: PRT	
<213>: Artificial Sequence	
<400>: 2	
Ala	5
Glu	10
Ala	15
Ala	20
Ala	25
Ala	30
Ala	35
Ala	40
<210>: 3	
<211>: 16	
<212>: PRT	
<213>: Artificial Sequence	
<400>: 3	
Ala	5
Glu	10
Ala	15
Ala	20
Ala	25
Ala	30
Ala	35
Ala	40
<210>: 4	
<211>: 16	
<212>: PRT	
<213>: Artificial Sequence	
<400>: 4	
Ala	5
Glu	10
Ala	15
Ala	20
Ala	25
Ala	30
Ala	35
Ala	40